



艾迪基因
EDITGENE

加速基因编辑进程,造福人类健康

www.edgene.cn



AAVS1 定点敲入试剂盒使用说明书

AAVS1 Targeted Knock-In Kit

艾迪基因 | <https://www.edgene.cn/> | market@edgene.cn | 18102225074 (微信同号)

亚太办事处: 020-3223-8856 | 美国办事处: 833-2263234

总部地址: 广东省广州市黄埔区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D栋5F



在线客服



扫码关注服务号



【产品简介】

本试剂盒依托艾迪基因自主开发的Flash-RNP™ 递送系统，整合AAVS1位点特异性同源重组模板（AAVS1-FLASH-Donor）与新型KI增强剂（KI Enhancer），可在人类基因组AAVS1安全港位点实现高效率、高保真的外源基因定点敲入。系统基于RNP复合物瞬时递送，兼顾编辑效率与细胞安全性，有效规避质粒或病毒载体带来的随机整合与脱靶风险。试剂盒提供从供体设计、编辑递送到阳性筛选的全流程优化方案，尤其适用于定点报告基因标记、功能基因稳转株构建、以及可诱导表达系建立等应用场景。整体操作流程精简，可在一周内完成阳性多克隆获取，编辑效率显著高于传统HDR（同源定向修复）策略，为您的基因工程研究提供高效、可靠的一站式工具。

【储存条件及有效期】

- RNP 复合物与 Donor: -80℃ 保存，有效期 6 个月，避免反复冻融。
- KI enhancer drug: -20℃ 保存，有效期 12 个月。
- 建议根据使用次数进行分类，避免反复冻融影响产品活性。

【产品组分】

产品编号	组分	规格	备注
EDNCP-001	递送载体-RNP 复合物 (sgRNA)	150 µL	等量使用
	同源重组模板 (Donor)	150 µL	
	KI enhancer drug 1	25 µL	1000× 储存液
	KI enhancer drug 2	25 µL	1000× 储存液

【实验步骤】





1. 细胞培养和铺板 (以 24 孔板为例)

细胞培养至生长旺盛状态, 转染前 24 h, 接种细胞至 24 孔板 (对于贴壁细胞, 使转染时细胞汇合度为 50%~60%; 对于悬浮细胞, 使转染时细胞数量为 $1.2 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^5$)。

请使用生长状态较好的细胞, 并确保细胞无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞, 请在转染前至少传代两次。

2. 细胞转染

转染前观察细胞状态, 符合转染条件再从 -80°C 取出 Flash-RNP 与 Flash-Donor 复合物, 置于 4°C 缓慢解冻。

对于贴壁细胞的要求: 细胞状态好, 分布均匀, 汇合度为 50%~60%, 则可进行转染;

对于悬浮细胞的要求: 细胞状态好, 死细胞和细胞碎片少, 分散均匀, 可进行转染。

贴壁细胞: 去掉旧培养液, 每孔加入 350 μL 新鲜培养液, 再分别加入 75 μL FALSH-RNP、75 μL FALSH-Donor、0.5 μL KI enhancer drug 1 和 0.5 μL KI enhancer drug 2。

悬浮细胞: 500g 5min 离心收集细胞, 加入 350 μL 新鲜培养液重悬细胞, 再分别加入 75 μL FALSH-RNP、75 μL FALSH-Donor、0.5 μL KI enhancer drug 1 和 0.5 μL KI enhancer drug 2。

加入后轻轻晃动混匀, 37°C 培养箱中静置孵育 24 h。

3. 换液与继续培养

24 h 后移除含药的培养液, 更换为完全培养基, 正常传代培养。一般情况下转染 5-7d 基因敲入效率达到最高, 可收集细胞检测。

备注: 若插入的 Cargo 序列中有真核抗性 (如 Puromycin、Neomycin 等), 可适当进行药物筛选以富集阳性细胞。





【基因型PCR鉴定与测序检测】

转染后 5-7 天（或药物筛选富集后），应通过基因型PCR对细胞池（Cell Pool）或单克隆进行初筛，以确认 AAVS1 位点是否发生正确的同源重组敲入（HDR）。

1. 引物设计策略

基因型PCR初筛的核心原则是：通过PCR产物大小及电泳条带，有效排除随机整合（Random Integration）与 Donor 模板残留干扰。因此，推荐同时使用以下两种策略的引物对进行检测。

策略一：外侧引物 + 内部引物

引物对（Pair 1）：正向引物（F-outer）设计在 AAVS1 同源臂外侧的基因组序列上（不包含在 Donor 同源臂内）；反向引物（R-internal）设计在插入的 Cargo 序列内部（如报告基因 eGFP、tag 序列或 P2A 区域）。

策略二：位点两端引物

引物对（Pair 2）：在 AAVS1 插入位点的两侧各设计一条引物（F-out 和 R-out），这对引物可同时扩增野生型等位基因和敲入等位基因。

AAVS1定点敲入试剂盒位点两端引物推荐：

F-out : cggaactctgccctctaacg;

R-out: cagtgaccaaccatccctgt。

2. 测序鉴定与连接处验证

PCR 电泳只能判断片段大小，必须通过 Sanger 测序确认连接处序列的准确性，才能最终确认敲入成功。建议将上述2种策略引物的 PCR 产物进行切胶纯化后作为测序模板。

【注意事项】

- 建议使用生长状态良好的细胞，避免使用老化或污染细胞。
- AAVS1-Flash-RNP 与 AAVS1-Flash-Donor 避免反复冻融，建议分装保存。





- KI enhancer drug 为 1000× 浓缩液, 请按比例稀释使用。
- AAVS1 位点敲入说明: AAVS1 位点位于人 19 号染色体 PPP1R12C 基因的内含子区域, 在该位点敲入外源基因不会影响内源基因功能, 可实现外源基因的长期稳定表达。Donor 设计已针对 AAVS1 位点进行优化, 确保同源臂序列的特异性与重组效率。
- 使用该产品发表文章时, 请标注我司名称: EDITGENE (EditGene Co., Ltd.), AAVS1 定点敲入试剂盒 (CAS: EDNCP-001)

【产品背景】

1. 为什么选择 AAVS1 安全港位点？

AAVS1 (又名 PPP1R12C) 位点位于人第 19 号染色体 (19q13.42), 是一个经过充分验证的基因组“安全港”位点^{1,2}。该位点具有以下核心优势:

- ① 开放染色质结构: AAVS1 位点处于转录活跃区域, 周围染色质呈开放构象, 能够确保插入的外源基因实现长期、稳定表达。
- ② 无表型影响: 在该位点插入外源基因不会干扰内源基因的正常功能, 已被证明对细胞无不良表型影响。
- ③ 广泛应用验证: AAVS1 位点已被广泛应用于稳转细胞系构建、报告基因标记、基因过表达等研究场景。
- ④ 避免随机整合风险: 定点整合至 AAVS1 位点可避免外源基因随机插入基因组带来的潜在安全风险。

因此, AAVS1 位点是基因敲入和稳转细胞系构建的理想靶点。

2. FLASH-KI 技术平台简介

本试剂盒基于艾迪基因自主研发的 FLASH-KI 高效定点整合平台, 整合了两大核心技术:

核心技术一: FLASH-KI 共递送系统——将 RNP 复合物与 Donor 模板同步递送至细胞内, 提高修复模板与编辑位点的时空匹配度, 大幅简化操作流程。该递送方式为蛋白递送, 避免了 DNA 质粒带来的免疫原性与随机整合





风险, Flash递送系统已覆盖 400+ 细胞系验证。

核心技术二: KI enhancer drug (NHEJ 抑制剂) —— 在 CRISPR 介导的 DNA 双链断裂修复中, 通过短暂、可逆地抑制 NHEJ 修复途径, 迫使细胞优先选择 HDR 同源重组修复, 从而将敲入效率提升 5-7 倍。

- 1 Ahmed, A. *et al.* Human Genome Safe Harbor Sites: A Comprehensive Review of Criteria, Discovery, Features, and Applications. *Cells* **15**, doi:10.3390/cells15010081 (2026).
- 2 Hayashi, H., Kubo, Y., Izumida, M. & Matsuyama, T. J. S. r. Efficient viral delivery of Cas9 into human safe harbor. **10**, 21474 (2020).

